

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Graptoliitargilliidist eraldatud bakteriaalsete isolaatide
kirjeldamine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Esper Rasmus Antson

Juhendaja PhD Anne Menert

TARTU 2020

Graptoliitargilliidist eraldatud bakteriaalsete isolaatide kirjeldamine

Graptoliitargilliidis leidub metalle, mille kaevandamine võib olla majanduslikult tulus. Maagis elavaid mikroorganisme on võimalik kasutada soovitud metallide eraldamiseks. Käesoleva töö eesmärgiks on kirjeldada argilliidist eraldatud isolaate erinevate kultiveerimis- ja biokeemiliste katsete teel.

CERCS:

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Märksõnad: graptoliitargilliit, bioleostamine, metalloporfüriinid, mustad kildad

Description of bacterial isolates from graptolite argillite

Graptolite argillite contains metals which could be mined in profitable way. Microorganisms living in ore can be used to extract wanted metals. The aim of this study is to describe isolates from argillite by various cultivation and biochemical tests.

CERCS:

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Keywords: graptolite argillite, bioleaching, metalloporphyrins, black shales

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Graptoliitargilliit	6
1.2 Teised mustad kildad.....	9
1.3 Metalloporfüriinid	10
1.4 Anaeroobses lagunemises osalevad mikroorganismid	11
1.5 Metallorgaaniliste ühendite biodegradatsioon	12
1.6 Metallide bioleostamine	12
1.7 Mustade kiltade lõhustamine mikroobikoosluse abil koos metallide leostumisega.....	13
1.8 Puhaskultuuride eraldamise meetodid.....	13
1.9 Tööstuslike inokulumide selektsiooni põhimõtted.....	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja metoodika.....	16
2.3 Tulemused ja arutelu	20
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
TÄNUSÕNAD	29
KASUTATUD KIRJANDUS	30
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	32

KASUTATUD LÜHENDID

GP – Gram-positiivne bakter

GN – Gram-negatiivne bakter

DPEP porfüriiniühendid – Deokofüülerütroetio-porfüriiniühendid

hP – hektopaskal

mQ – MilliQ vesi

MP-VP sööde – metüülpunase Voges-Proskaueri sööde

ppm – miljondikosa

Suc – sahharoos

Glc – glükoos

Fru – fruktoos

Xyl – ksüloos

Ara – arabinoos

Man – mannitool

Malt – maltoos

SISSEJUHATUS

Põhja-Eesti maapõues esinev graptoliitargilliit on geoloogiliselt ja majanduslikult huvipakkuv kivim. Selle kivimi teeb tähelepanuväärseks metallide kõrge kontsentratsioon, mis on uurijaid pannud arutlema argilliidi kaevandamisvõimaluste üle. Üheks metallide eraldamise võimaluseks peetakse mikroorganismide kasutamist (bioleostamist).

Mikroorganismide mitmekesisus annab erinevaid võimalusi biokaevandamiseks. Metalle võib kivimist kätte saada nii bakterite, arhede kui ka seente abiga. Sellise ülesande jaoks sobivaid mikroorganisme otsitakse tavaliselt kaevandatavast kivimist.

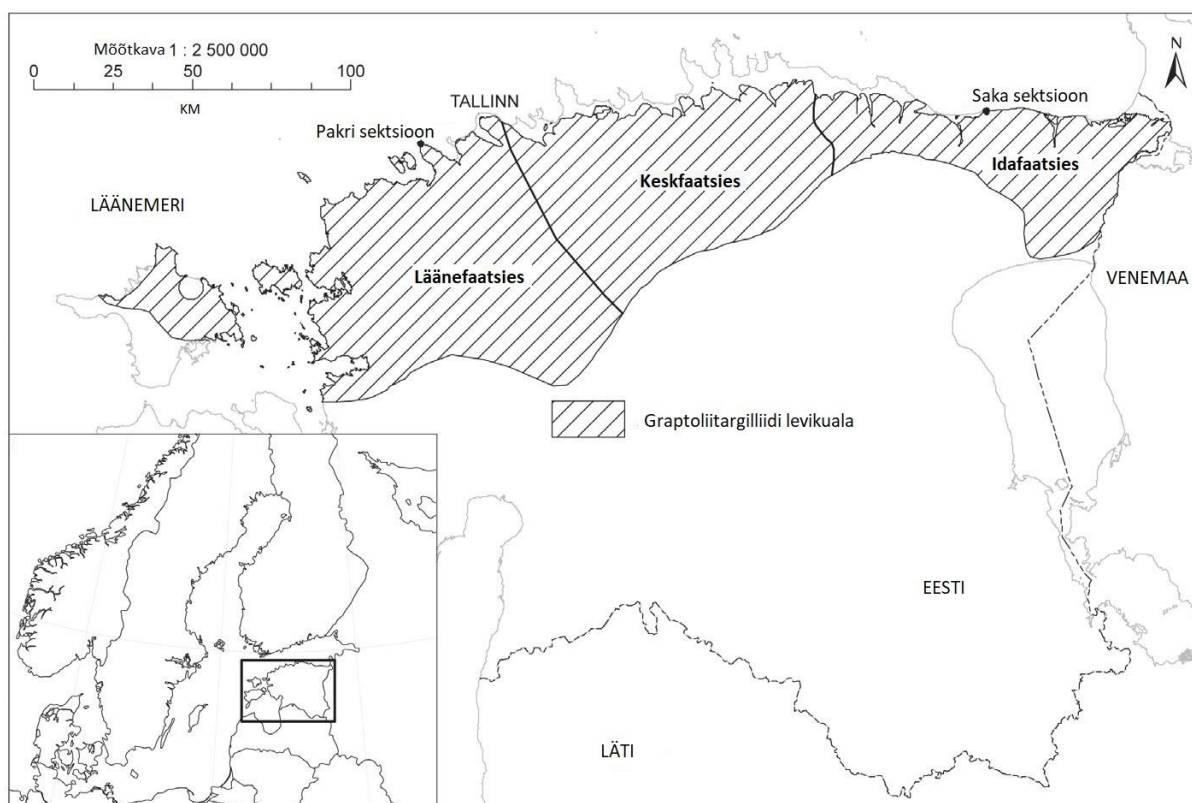
Käesolevas töös oli kasutusel 15 bakterite isolaati, keda isoleeriti Põhja-Eesti graptoliitargilliidist. Nende võimekusi ja erinevusi katsetati biokeemiliste testide abil. Kultiveerimiskatsetes argilliidiga mõõdeti rõhumuutust, mis tuleneb gaasi eraldumisest bakterite elutegevuse käigus.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Graptoliitargilliit

Graptoliitargilliit on orgaanilise aine poolest rikas kõvastunud savikivim. Tremadoci lademest pärinevat graptoliitargilliiti leidub nii Põhja-Eestis kui ka Hiiumaal. See asetseb Kallavere kihistu liivakividest pealpool ning glaukoniiti sisaldavatest savidest ja liivakividest allpool. Graptoliitargilliidis leidub nii metalle (näiteks uraani ja molübdeeni) kui ka orgaanilist ainet. Loode-Eestis on argilliidi kiht kõige paksem, kuid selle paksus väheneb lõuna ja ida pool. Graptoliitargilliit on osa kambriumi ja vanema ordoviitsiumi mustadest kiltadest, mida leidub laiguliselt Äänisjärve piirkonnast kuni Kaledoonia mäetekke alani Norras.

Graptoliitargilliidi uurimisel on oluline **uraani, molübdeeni ja vanaadiumi** sisaldus. Nende kaevandamine võib olla tulevikus väärtuslik. Metallide erineva kontsentratsiooni järgi saab Põhja-Eesti jagada kolmeks osaks: lääne-, kesk- ja idaaladeks (faatsiesteks). Neid alasid peetakse silmas, kui uuritakse metallide ebaühtlase esinemise kujunemist kivimikihtides (joonis 1).



Joonis 1. Graptoliitargilliidi levik Eestis (Voolma *et al.*, 2013)

Tavapärased graptoliitargilliidi mineraalid on kvarts, savimineraalid ja kaaliumpäevakivi. Savimineraalide osakaal ida suunas väheneb, kuid kvartsi osakaal suureneb. Kvartsi ja

kaaliumpäevakivi kristallilised struktuurid on üsna hästi välja kujunenud ning kivimis küllalt laialt levinud.

Artiklis (Voolma *et al.*, 2013) mõõdeti Põhja-Eestis metallide esinemise kontsentratsioone. Selleks võeti läänefaatsiesest 21 graptoliitargilliidi proovi Pakri poolsaarel asuvast Pakerordi lademest. Idafaatsiese kivimite üheksa proovi olid pärit Saka pangast Ida-Virumaal. Proovid võeti vertikaalselt iga 20 cm tagant. Umbes 2 kg kaaluvaid proove enne nende analüüsimist töödeldi (puhastati ja purustati). Keemilise analüüsi jaoks kasutati Tallinna Tehnikaülikooli XRF (*X-ray fluorescence*) röntgenspektromeetrit ja induktiivsidestatud plasma massispektromeetrit. Proovide orgaanilise aine sisaldust iseloomustavat LOI (*loss of ignition*) väärtust mõõdeti 500°C ja 920°C juures. Proovide elementkoostist analüüsiti samuti ACMELABS laborites Kanadas. Mineraloogiline analüüs tehti röntgendifraktomeetriga ja osad proovid analüüsiti skaneeriva elektronmikroskoobiga.

Selgus, et põhielementide koosseis Lääne- ja Ida-Eesti proovide kihtides erineb üsna vähe. Ränidioksiidi osakaal on mõnevõrra kõrgem graptoliitargilliidi ülemises osas. Orgaanilise aine esinemine oli pöördvõrdelises seoses ränidioksiidi esinemisega. Alumiiniumoksiidi esinemine näib olevat kõrgem Pakri Lääne-Eesti proovides ning titaani kontsentratsioonid paistavad olevat selges kooskõlas alumiiniumi kontsentratsioonidega. Kui võrrelda Skandinaavia maarjaskilda (*alum shale*), Austraalia arhaikumi järgsete kiltade (*Post Archaean Australian Shale*) ja Põhja-Ameerika kiltadega (*North American Shale Composite*), siis Eesti graptoliitargilliidile on omane kõrgem kaaliumi kontsentratsioon. Kaaliumoksiidi rohkus Eestis võib olla seotud kaaliumpäevakivi esinemisega. Eesti kivimis on siiski vähem kaltsiumi, naatriumi, magneesiumi ja mangaani okside. (Gromet *et al.*, 1984)

Raud ja väävel on põhielemendid, mille kontsentratsioonid ei olnud Saka proovides omavahel eriti selgelt kooskõlas. Pakri proovides olid need elemendid selgelt koos ning väävel paistis pigem olema seotud raudsulfiididega kui orgaanilise ainega. Kuigi fosfor- ja kaltsiumoksiidide sisaldused on kivimis üldiselt madalad, siis difosforpentaoksiidi kontsentratsioonid on osadel kõrgusjoontel üllatavalt kõrged. Saka proovides on mõnevõrra kõrgem kaltsium- ja fosforoksiidide tase. Pakri proovides on suurem osakaal titaan-, magneesium- ja alumiiniumoksiididel (võrreldes Saka proovidega). (Voolma *et al.*, 2013)

Vanaadiumi ja uraani kontsentratsioonid on graptoliitargilliidis väga kõrged, kui võrrelda seda Austraalia ja Põhja-Ameerika kiltadega. Idafaatsiese proovides on nende kontsentratsioonid mitu korda suuremad kui Põhja-Ameerikas. Ka kõige väiksemad mõõdetud

kontsentratsioonid on metallidel küllalt kõrged: uraanil 30 miljondikosa (ppm), pliil 100 ppm, molübdeenil 200 ppm ja vanaadiumil 1000 ppm. (Pukkonen & Rammo, 1992)

Erinevate jälgmetallide kontsentratsioonid vertikaalsuunas ei ole ühtlased. Pakri proovide alumises osas esineb **antimoni, molübdeeni ja uraani** koos suurema orgaanilise aine hulga. Vanaadiumi ja uraani kontsentratsioonid muutuvad juhuslikult, kuid molübdeeni esinemine väheneb ülemiste kihtide suunas. Samuti ei saa kindlaid üldistusi teha Saka kihtide kohta, kus uraani ja molübdeeni osakaalud erinevatel kõrgusjoontel tunduvad juhuslikult hüppelised. Kuigi Saka proove võeti õhemast graptoliitargilliidi kihist, siis kolme metalli (U, Mo ja V) keskmine sisaldus paistab olevat suurem. Üldiselt langeb nende metallide sisaldus mustades kiltades kokku orgaanilise aine esinemisega kivimis. (Vine & Tourtelot, 1970)

Pliid leidub nii Ida- kui Lääne-Eesti proovides üpris ühtlaselt ja sarnaselt ning see element esineb koos väävliga. Pakril leidub tsinki rohkem kui Sakas. Kaadmiumi ja tsingi kõrgemad kontsentratsioonid näitavad omavahelist kokkulangevust. (Voolma *et al.*, 2013)

Setete metallilist koostist pidi täiendavalt mõjutama vulkaanide aktiivsus. Kambriumi jooksul ja Tremadoci lademe kujunemisel võis iidse Baltika mandri juures Iapetuse ookeanis olla vulkaane. Arvatavasti moodustas vulkaaniline tuhk märkimisväärse osa kujunevas graptoliitargilliidis. (Utsal *et al.*, 1982)

Madalama kontsentratsiooniga metallid võivad esineda kooskõlas teiste metallide sisaldusega. Pakril näiteks esineb **lantaan** koos teatud **alumiiniumi** ja **titaani** kontsentratsioonidega. **Berülliumi** ja **nikli** kontsentratsioonide tõus on Pakril vastastikuselt seotud. Sarnaselt on omavahel seotud liitium ja magneesium nii Saka kui ka Pakri proovides.

Haruldaste muldmetallide sisaldust võrreldi arhaikumi järgsete kiltadega (*Post Archaean Australian Shale*). Nende metallide kontsentratsioonid Eesti graptoliitargilliidis on pigem sarnased mõõtmistega mujal maailmas. Suhteliselt kõrgemad kontsentratsioonid on Eestis samaariumil, euroopiumil, gadoliiniumil ja terbiumil. (Taylor & McLennan, 1985)

Redoksreaktsioonidele tundlikud (redoks-sensitiivsed) metallid kuhjuvad aja jooksul setetena nii sügavate kui ka madalate merede põhjas. Rannikulähedaste settekivimite uurimisel peab arvesse võtma, et iidse merepõhjas oli setete olukord pidevas muutumises. Sellepärast pigem tasub sarnast tüüpi kivimite proove koguda võimalikult piiratud alalt. (Algeo & Lyons, 2006)

Türisalu kihistu Tremadoci lademe mustades kiltades leidub metalle, mida võib pidada redoks-sensitiivseteks. Uurimiseks sobiva kivimikihi paksus Loode-Eestis on rohkem kui 6 m, Kirde-Eestis on see vähem kui pool meetrit. Mustade kiltade metallilise koostise uurimiseks võeti

Suur-Pakri saarel proovideks kaks teineteisele lähedal asuvat puursüdamikku. Nende täpsed asukohad on geodeetiliste koordinaatide süsteemi WGS84 järgi 59°20'13.07"N, 23°53'54.74"E ning 59°20'15.33"N, 23°54'33.8"E. Elementide esinemist proovides analüüsiti röntgenspektromeetri abil. Lisaks mõõdeti proovide LOI (*loss of ignition*) väärtust 500°C juures ning sellest sai tuletada orgaanilise aine sisalduse kivimeis. (Hints *et al.*, 2014)

Põhielementide koostis puursüdamike kiltades oli enamasti ühetaoline. Mustad kildad koosnevad osakestest, mis on saviosakestest jämedamad ja liivaosakestest peenemad. Nendes esineb rohkelt kaaliumpäevakivi mineraali.

Redoks-sensitiivsete elementide koostis oli erinevatel sügavustel erinev. Keskmiselt arvatav vanaadiumi sisaldus on 1100 ppm, molübdeenil 150 ppm ja uraanil 115 ppm. Vanaadiumi esinemise ja LOI 500°C väärtused on omavahel mõneti kokkukäivad. Molübdeeni ja uraani kontsentratsioonid ei korreleeru LOI 500°C väärtustega kuigi palju. Molübdeeni kõrgem tase on puursüdamiku ülemises ja alumises osas, kuid uraani leidub rohkem keskel.

Hapniku olemasolul on redoks-sensitiivsed elemendid liikuvad ning redutseerivas keskkonnas on need liikumatud. Merevee koostis Tremadoci lademe kujunemisel ei ole kuigi hästi teada. Sellele ajale eelnenud hilises kambriumis oli merevesi enamasti hapnikuvaene ja väävlirikas. Põhjasetete segustamise jäljed organismide poolt lubavad oletada, et hapnik oli olemas vee ja setete kokkupuutekohas. (Pukkonen & Rammo, 1992)

Vanaadiumi tsükliline esinemine võis olla mõjutatud merevee ringlusest temperatuuri ja soolsuse mõjul. Samas võib vanaadiumi esinemine olla mõjutatud ka toitainete sissevõtmist organismide poolt ja süsiniku võtmisest orgaanika koosseisu.

Seniste teadmiste põhjal on uraani võimalik redutseerida üksnes setetes, mis on erinev vanaadiumist ja molübdeenist, mida saab redutseerida ka merevees. On leitud, et bioloogiliste jäänuste (mikroobide) suurem kontsentratsioon on kooskõlas uraani kõrgema kontsentratsiooniga. Katsed on samuti näidanud, et mikroobide anaeroobne hingamine metalliga võib toimuda koos Fe(III) redutseerimisega. Uraani püüdmine saab seega toimuda anaeroobse hingamise tulemusel. (Hints *et al.*, 2014)

1.2 Teised mustad kildad

Settekivimite aladel on mitmete metallide ja mineraalide peamised leiukohti. Näiteks kuld, vask, tsink, raud, plii ja barüüt on just nendes kohtades olemas ning sageli võivad nad esineda koos süsivesinikega ja orgaanika poolest rikaste kiltadega. Sellist koosinemist on täheldatud

Mississippi oru aladel, kust võib leida tsinki ja eriti kõrgetes kontsentratsioonides pliimaake. (Laznicka, 1999)

Kihistunud kivimites olevad metallid võivad kujuneda väärtuslike metallide allikaks. Poola *Kupferschieferi* kiltades on leitud üsna suure kontsentratsiooniga kulda ja platinametalle. Need väärtusikud maagikihid on õhukesed ja see on takistanud nende kasutusele võtmist. Samad metallid on olemas ka teistes leiukohtades nagu Hiina Guizhou provintsis ja Kanada Yukoni alal. (Kucha, 1982)

Karjala šungiidi kujunemisel ei puutunud metallirikas soolase vee kiht kokku setetega, sest šungiidis on metallide osakaal väike. Šungiidist on jällegi leitud fullereenide molekule ning fullereenide sünteesimiseks vajalikke lähteaineid. (Melezhik *et al.*, 2004)

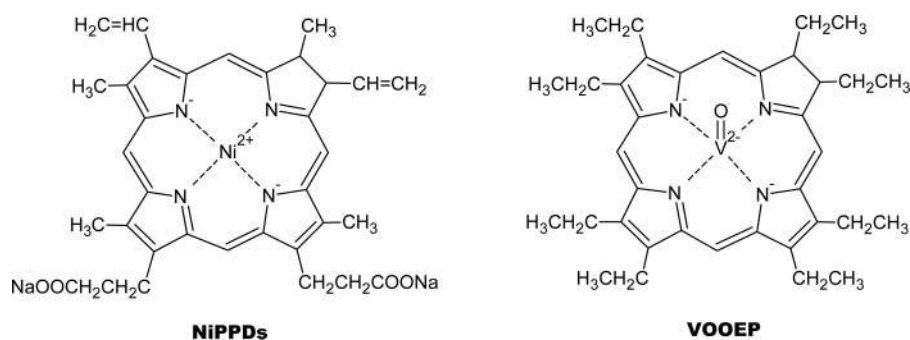
Hiina Hunani provintsis asuv Xikuangshan on väga suur antimoni päritolukoht. Sealne antimon paikneb devoni ajastu mustades kiltades, milles on palju orgaanilist süsinikku. Guangxi autonoomses piirkonnas leitud devoni mustad kildad sisaldavad suures kontsentratsioonis tina. Kivimites leiduv väävel on ilmselt osaliselt elusorganismide tegevuse tulemus.

Barüüti leidub suuremal hulgal Hiinas, Nevada osariigis ja Andhra Pradeshis osariigis Indias. Need alad ja barüüdi esinemine California rannikuvete juures lasevad oletada, et suurem barüüdi kuhjumine toimus soojemate soolaste vee kihtide või bioloogilise tegevuse tulemusel.

Mangaani kuhjumine Rumeenia Karpaatide mustades kiltades on ilmselt kujunenud hapnikuvaeste ja hapnikurikaste veekihtide kokkupuutel. Siberis asuva Suhhoi Logi mustades kiltades on väga suur kulla osakaal, kuid metallide ja orgaanilise aine kontsentratsioonid ei näidanud seal märkimisväärset omavahelist kokkulangevust. Ühe Šotimaa kaevanduse lähedusest on leitud metallirikast bituumenit. (Coveney & Pašava, 2004)

1.3 Metalloporfüriinid

Osa mustades kiltades leiduvatest metallidest paikneb tsüklilistes orgaanilistes ühendites (metalloporfüriinides). Niklit ja vanaadiumi esineb näiteks naftas ja põlevkivis leiduvate porfüriinide koosseisus (joonis 2). Toornafta metallide kogusisaldusest peitub arvatavasti 10 protsenti porfüriinsetes ühendites.



Joonis 2. Nikli ja vanaadiumi porfüriinid (Cordero *et al.*, 2015)

Tundub, et mitmed porfüriinid on kujunenud heemide ning bakterite ja vetikate klorofüllide lagundamisest. Deokofüülerütroetio-porfüriinide (DPEP porfüriiniühendite) algseks allikaks peetakse pigменти klorofüll a, kuid muude porfüriinide täpne päritolu ei ole alati otseselt selge.

Toornafta kokkupuude vesilahusega võib haarata metalloporfüriine naftast ära ja levida keskkonda. Ulatusliku nafta lekkimise korral suureneb seetõttu metalliline saastumine keskkonnas. (Czernuszewicz, 2000)

1.4 Anaeroobses lagunemises osalevad mikroorganismid

Orgaanilisi aineid sisaldavates söekihtides ja kiltades leiduv metaan võib vähemalt osaliselt olla mikroobse päritoluga. Metaani tekkimisel on esindatud nii bakterite kui ka arhede elutegevus. Keerulisemad orgaanilised ained lagundatakse bakterite poolt kõigepealt alkaanideks ja aromaatsseteks vaheühenditeks. Seejärel lagundatakse vahepealsed ühendid omakorda substraatideks, millest metanogeensed mikroobid saavad metaani toota. (Martini *et al.*, 2003)

Metanogeenide poolt kasutatavad substraadid on sageli süsinikdioksiid ja vesinik, millest saab toota metaani ja vett. Etaanhapest toodavad metanogeenid nii metaani kui ka süsinikdioksiidi. Peale selle on substraatidena kasutatavad ka metanool ja metaanhape.

Kiltadest ja söekihtidest leitud bakterid on osaliselt kindlaks määratud. Süsivesinikke lagundavad bakterid kuuluvad hõimkondadesse *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* ja *Bacteroidetes*. Aktinobakterid on tavaliselt aeroobsed süsivesinike lagundajad ning nende osalemine anaeroobsel lagunemisel ei ole kindlalt teada. (Colosimo *et al.*, 2016)

Mikroobikooslustes on suurem osakaal proteobakteritel ja aktinobakteritel. Proteobakterite hõimkond on mitmekesine ning metaani tekitamisega on seotud α -, γ - ja δ -proteobakterite klassid.

Orgaanilise substraadi lagundamine saab toimuda nii aeroobselt ja anaeroobselt. Metaani tootmine metanonogeenide poolt on rangelt anaeroobne protsess. Söekihtide koosluste DNA-d uurides on leitud, et bakterite mitmekesisus on seal suurem kui arhedel. (Ritter *et al.*, 2015)

1.5 Metallorgaaniliste ühendite biodegradatsioon

Tavaliselt leiduvad mingit reostust lagundavad mikroorganismid selle reostuse leidumise kohas. Õliga saastunud pinnasest saab isoleerida mikroobe, kes on suutelised lagundama metalloporfüriine. Niklit ja vanaadiumi sisaldavate porfüriinide lagundamisel katsetati, missugused mikroorganismid viivad seda tõhusamalt läbi. Mikroobe kasvatati nädala jooksul söötmetel, millele oli lisatud nikli ja vanaadiumi porfüriine. (Cordero *et al.*, 2015)

Bakteritest olid olulisemad lagundajad *Bacillus megaterium* ja *Enterobacter cloacae*. Seentest olid esindatud *Aspergillus unguis* ja *Penicillium griseofulvum*. Nikli porfüriine lagundati edukamalt kui mitu liiki baktereid kasvatati samal söötmel koos. *Bacillus* ja *Enterobacter* ning seente puhul *Penicillium* ja *Aspergillus* esindajad olid söötmel koos olles tõhusamad. (Cordero *et al.*, 2015)

Saprotroofne seen *Penicillium griseofulvum* on saaste suhtes vastupidav. Tema puhul näidati, et ta võib ellu jääda tsükloheksaanide ja mürgiste metalliühenditega saastunud keskkonnas ning lagundada seejuures saasteaineid. (Ceci *et al.*, 2018)

Porfüriinide lagundamise seisukohalt olid bakteritel sobivamad tingimused 30°C ja pH 7 juures. Seentele olid sobilikud 20 °C ja pH 4. Sobivaim porfüriinide kontsentratsioon söötmes oli 20 mg/L. Katse käigus tõusis lagundatud porfüriini osakaal iga päevaga ning kõige kõrgem osakaal saavutati katse seitsmendal päeval. (Cordero *et al.*, 2015)

1.6 Metallide bioleostamine

Kanada Yukoni ala mustade kiltade uurimisel Peel River asukohas võrreldi erinevaid metallide eraldusviise. Tavapäraselt kuumutamist ja sulatamist ei eelistatud, sest kohaliku kivimi peeneosalisus takistab vajaliku kontsentraadi valmistamist. Kuumutamise puhul võivad metallid õhus lendumisega kaotsi minna ning suurendada mürgitusohtu.

Mineraalidest metallide eraldamine osutus võimalikuks mikroorganismide abil. Biohüdrometallurgia on mõnedes kaevandustes kasutatav meetod. Soomes on Talvivaara

kaevanduse kiltadest mikroobide abil eraldatud olulisi metalle (näiteks niklit). Eraldamise järel saab sadestamisega metalle lahusest kätte. (Gadd *et al.*, 2019)

Bioleostamise puhul muudetakse mittelahustuvas olekus metall mikroorganismide abil lahustuvaks. Metalle eraldatakse maagist oksüdeerumise teel. Leostamisel osalevatest atsidofiilsetest bakteritest on tuntumad *Firmicutes*, *Actinobacteria* ja *Proteobacteria* hõimkonnad. Nende hulgas on mesofiile, termofiile ja ekstreemseid termofiile. Arhedest on peamiselt esindatud ekstreemsed termofiilid. Vase leostamisel kalkopüriidist on väga tõhusad termofiilsed mikroobid ja eriti *Sulfolobus* arhed. (Mahmoud *et al.*, 2017)

1.7 Mustade kiltade lõhustamine mikroobikoosluse abil koos metallide leostumisega

Mitmed seened ja neutrofiilsed bakerid suudavad lõhustada *Kupferschieferi*-tüüpi kiltade orgaanilisi aineid. Näiteks alkaanide lõhustamine saab alguse metüülrühma oksüdeerimisest. Bakterite peroksidaasidega saab lagundada keerulisi orgaanilisi ühendeid ning kivimi orgaanilise aine lõhustamine toimub seetõttu tõhusalt. Ensüümi oksüdeeriv toime tuleneb vesinikperoksiidi juuresolekust. Orgaanilise aine lagundamine parandab maagi ettevalmistamist metallide eraldamise eesmärgil. (Kutschke *et al.*, 2015)

Kesk-Saksamaa *Kupferschieferi* kiltadega katsetati bioleostamist mikroorganismide abil. Selleks kasutati ettekasvatatud atsidofiilsete oksüdeerijate segakultuure. Inokuleeritavatest tüvedest olid esindatud liikide *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* ja *Acidiphilium* tüved.

Mineraalsesse söötmesse lisati maaki sisaldusega 2% ning Fe(II) kontsentratsiooniga 50 mg/L. Inokuleerimise järel toimus katse loksutil 30 °C juures ja pimeduses. Võrdluse jaoks jäeti teised lahused inokuleerimata või steriliseeriti. Katse tulemusena leiti, et inokuleeritud lahuses oli tsiingi ja vase kättesaadavus selgelt suurem. (Kamradt *et al.*, 2012)

1.8 Puhaskultuuride eraldamise meetodid

Kindlat tüüpi mikroorganismide uurimisel on tähtis, et oleks kasutatud ainult ühte tüüpi mikroobe sisaldavaid kultuure. Niisuguseid kultuure nimetatakse puhaskultuurideks. Puhaskultuure saab eraldada esialgsetest rikastuskultuuridest, mida omakorda saadakse inokulumi külvamisel ja inkubeerimisel selektiivsöötmetel. Rikastuskultuuri määravateks

teguriteks on söötme pH, olemasolevad toitained ja inkubeerimise tingimused (nt temperatuur). (Heinaru & Naanuri, 2015)

Lihtsam viis puhaskultuuride eraldamiseks on joonkülvi järel üksikute kolooniate kättesaamine (tuntud kui *streak plate* meetod). Steriilse tardsöötmega Petri tassile tõstetud kultuur aetakse ühes suunas külvinõelaga laiali. Seejärel tõmmatakse söötmel jooni uues suunas teistsuguse nurga all. Iga uue tõmbega on bakterite levik söötmel järjest hõredam, tänu millele peaksid söötmele ilmuma üksikuid kolooniaid.

Anaeroobsete puhaskultuuride isoleerimiseks saab kasutada agari lahjendusi katseklaasides (tuntud kui *agar shake* meetod). See kujutab endast rakususpensiooni inokuleerimist sulatatud agarisse. Rohkem lahjendatud katseklaasides ilmub bakterikolooniaid vähem ja hõredamalt. Anaeroobsust agaris aitab hoida agari peale valatud parafiini ja mineraalõli kiht.

Eraldatud kultuuri puhtus on vaja hiljem üle kontrollida. Grami järgi värvimise järgselt saab kultuuri vaadelda mikroskoobi abil. Sealjuures on tähtis kontrollida, et puhaskultuur ei oleks saastunud teist tüüpi mikroorganismide rakkudega. Samuti tuleks üle vaadata kolooniate tunnused erinevatel söötmetel. Mikrobioloogilised testid erinevatel söötmetel aitavad täpsemalt üle vaadata puhaskultuuri tunnuseid. (Madigan *et al.*, 2012)

1.9 Tööstuslike inokulumide selektsiooni põhimõtted

Bioleostamisel edukate mikroobide otsimisel tuleb silmas pidada, missuguseks kujuneb keskkond protsessi käigus. pH tase ja hapniku olemasolu või puudumine peavad olema mikroorganismi kasvuks sobilikud. Kuna mikroorganismide mineraalidest rikastamise keskkond on üldiselt anorgaaniline, siis suurem tähtsus on autotroofidel. (Hallberg & Johnson, 2001)

Bioleostamise puhul eelistatakse mikroorganisme, kes lagundavad mineraale võimalikult kiiresti. Tõhusamad mikroorganismid on just need, keda on varem lisatud reaktoritesse, kus bioloogiline oksüdeerimine toimub. Bioleostamise edukus võib kujuneda mitmete aastate jooksul, mistõttu ei saa eeldada, et uued mikroorganismid (keda varem pole leostamisel palju kasutatud) teeksid soovitud tööd piisavalt kiiresti. (Rawlings & Silver, 1995).

Inokulumide kujundamiseks on erinevaid võimalusi. Mitmekesist mikroobide kogumit saab kasutada katsetes ning seejärel määrata, millised esindajad kogumist olid leostamisel parimad (*top down*). Teine võimalus on kasutada kindlalt määratud bakterite kogumit, kus on vaid osad esindajad olemas. Tavaliselt on seal vajalik raua- ja väävlioksüdeerijate olemasolu (näiteks

Leptospirillum ferriphilum ja *Acidithiobacillus caldus*). Sellise mikroobide kogumi kasutamisel on peetud silmas kivimi omapära. Katsete käigus muutub bakterite koosseis keerulisemaks (*bottom up*). Esile tulevad siis ka heterotroofid, kes kasutavad ära orgaanilisi aineid.

Mikroobide mitmekesisus on inokulumide puhul oluline, sest tingimused protsessi käigus võivad muutuda. Bioleostamisel muutub sageli temperatuur, mille puhul on bakterite taluvus erinev. Kuna oksüdeerimisel suureneb temperatuur, siis oleks hea termofiilide olemasolu. (Rawlings & Johnson, 2007)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

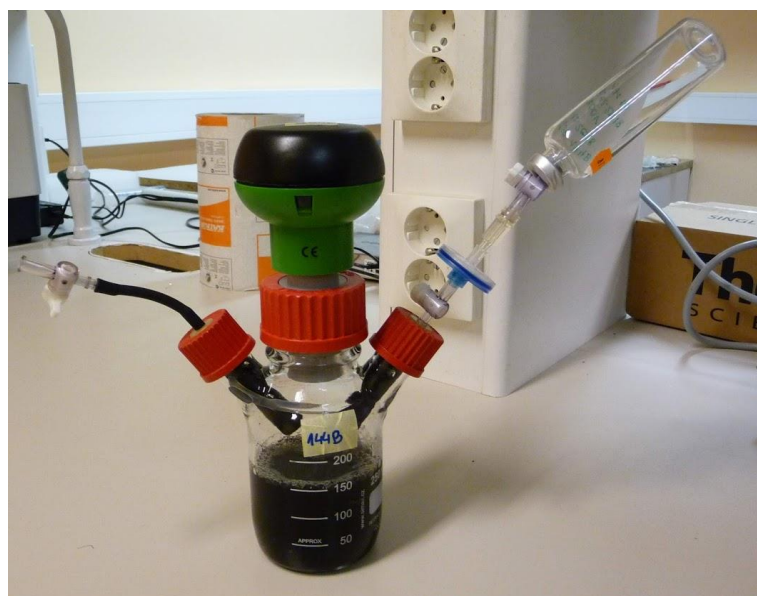
2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli argilliidis leiduvate mikroorganismide iseloomustamine. Selleks

- määrati OxiTop® katseseadmega isolaatidest koosneva segu ja kivimiproovist gaaside eraldumisest tulenev rõhumuutus;
- määrati isolaatide erinevusi biokeemiliste testidega ja vastupidavustestidega.

2.2 Materjal ja metoodika

OxiTop® katseseadmega saab mõõta süsteemis toimuvat rõhumuutust ning sellega seoses olevat gaasi ruumala muutust. Katseseade kujutab endast hermeetiliselt suletavat pudelit, millel on kolm korgiga suletavat ava. Keskmisele suuremale avale kinnitati pudeli sisemist rõhku mõõtvat seadmega kork. Külgmistele väiksematele avadele kinnitati korgid, mis olid mõeldud vedeliku- ja gaasiproovide võtmiseks (joonis 3). Kokku kasutati kuute OxiTop® katseseadet. Mõõtetulemuste järgi saab tuletada mikroobide kasvukõveraid.



Joonis 3. Oxitop® anaeroobsete katsete pudel

OxiTop® kultiveerimiskatsetel kasutati 23 m sügavuselt läänefaatsiesest pärinevat, Keila lähistelt puurkaevu puursüdamiku argilliiti (katastriüksus 72701:005:0639). Kivimiproovid saadi firmalt BiotaTec OÜ. Argilliit purustati uhmrus ning igasse katsepudelisse kaaluti 1,5 g argilliidipuru. Kolmes katseseadmes kasutati loomulikul kujul esinevat natiivset argilliiti (katsed 153, 153B, 153C). Teistes kolmes katseseadmetes kasutati steriilset argilliiti (katsed

152, 152B, 152C). Kivimi gammasteriilimist (50 kGy) viis läbi asutus Scandinavian Clinics Estonia OÜ.

Katsesegu koostist iseloomustab tabel 1. MilliQ (mQ) vees lahustati R2A söötme pulber, mille kontsentratsioon segus pidi olema 3 g/L. NaHCO_3 , Na_2S , betaiin ja tsüsteiin lahustati kõigepealt eraldi. Seejärel lisati need koostisosad R2A lahusesse filtersteriilimisega (süstlafiltriga poori suurus 0,2 μm). NaHCO_3 ja betaiini lahuse lisamist katsesegusse arvestati segu kogumahu (150 mL iga katsepudeli kohta) arvutamisel, tsüsteiini ja Na_2S lahuse kogust (5 mL) aga mitte.

Isolaatide inokulumi valmistamiseks kasutati 15 graptoliitargilliidist eraldatud isolaati, mida oli säilitatud -80 °C juures. Need külvati LB söötmega tassidele külvinõelaga. Tassid viidi 37 °C termostaati, kus kasvatamine toimus 24 h jooksul. Üleskasvanud isolaatide biomass suspendeeriti katsete alustamisel 1,5 mL tuubi 0,9% NaCl lahusesse. Tuubis olev isolaatide biomass suspendeeriti isolaatide lisamise söötmesse.

Inokulumi söötme koostis oli sarnane katsesegule. NaHCO_3 ja betaiini lahuse lisamisest arvestati söötme ruumala arvutamisel (vt tabel 2). Igasse OxiTop® katsepudelisse lisati 7,5 mL isolaatidest koosnevat inokulumi söötmes.

Kui argilliit ja isolaadid olid katsesegudesse lisatud, siis lisati OxiTop® pudelitesse argooni. Anumad asetati loksutile ning neid hoiti pimedas, et takistada fotosünteesi. Katseseadme käivitati seejärel andmehõive seadmega.

Katsetes kasutatud isolaatide tähistavad numbrid ja nende määratud tüved on esitatud tabelis 3. Mõnede isolaatide 16S rRNA geeni sekveneerimisel saadud järjestuste analüüsil määratud tüvi oli sama, kuid tassidel oli kolooniate läbipaistvus erinev. Näiteks tüved 7B4 (v) ja 10A (v) olid valgete kolooniatega, tüved 7B4 (lp) ja 10B (lp) olid tassil läbipaistvad.

Tabel 1. Katsesegu koostis OxiTop® katsetes

							Lahustan koos 15ml mQ-s		Lahustan koos 4,5 ml mQ-s	
Segu koostis R2A=3 g/L katse kohta							7,5 ml mQ	7,5 ml mQ	2,25 ml mQ	2,25 ml mQ
Katsesegu koostis	Lahust katses, mL	R2A ühele pudelile, g	Katsete arv	Lahust kokku, mL	R2A kõigile pudelitele, g	MilliQ ühele pudelile, mL	NaHCO ₃ (2,52g/L) , g	Betaiin (1,35 g/L) , g	Tsüsteiin (0,45 g/L)	Na ₂ S (0,225 g/L)
R2A (+ NaHCO ₃) + betaiin + Keila argilliit steriilne (1%) + 15 isolaati	150	0.45	3	450	1.35	135	0.38	0.20	0.068	0.034
R2A (+ NaHCO ₃) + betaiin + Keila argilliit natiivne (1%) + 15 isolaati	150	0.45	3	450	1.35	135	0.38	0.20	0.068	0.034
Kokku			6	900	2.70	810	2.27	1.22	0.405	0.203

Tabel 2. Isolaatide inokulumi söötme koostis

Inokulumi vaja 5%*150 ml=7,5 mL. Söödet inokulumidele vaja 3*7,5= 22,5mL kõigi proovide kohta							2,5 ml mQ	2,5 ml mQ	1 ml mQ	1 ml mQ
Isolaatide lisamise sööde	Lahust katses, varuga, mL	R2A ühele katsele, g	Katsete arv	Lahust kokku, mL	R2A kõigile katsetele, g	MilliQ kõigile katsetele, mL	NaHCO ₃ (2,52g/L) , g	Betaiin (1,35 g/L) , g	Tsüsteiin (0,45 g/L)	Na ₂ S (0,225 g/L)
R2A (+ NaHCO ₃) + betaiin + inokulum (15 isolaati)	8	0.024	6	48	0.144	43	0.12	0.06	0.022	0.011

Tabel 3. Katsetes kasutatud isolaadid

Isolaadi nr	Määratud tüvi	GenBank nr (koos lingiga)	CELMS nr (koos lingiga)
1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CP002622.1	EEUT ARG1
5	<i>Enterobacter hormaechei</i>	CP019889.1	EEUT ARG5
7A2	<i>Bacillus jeotgali</i>	KX417385.1	EEUT ARG7A2
7B11	<i>Bacillus thioparans</i>	KX555545.1	EEUT ARGB11
7B4 (v)	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	CP015286.1	EEUT ARG7B4V
7B4 (lp)	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	CP028366.1	EEUT ARG7B4Lp
10A (v)	<i>Bacillus fusiformis</i>	CP010820.1	EEUT ARG10A
10B (lp)	<i>Bacillus fusiformis</i>	CP010820.1	EEUT ARG10B
12	<i>Bacillus cereus</i>	MK517632.1	EEUT ARG12
14B3	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	CP023704.1	EEUT ARG14B3
16A1	<i>Bacillus humi</i>	MG385704.1	EEUT ARG16
18	<i>Rothia terrae</i>	JX869542.1	EEUT ARG18
22E1	<i>Staphylococcus warneri</i>	MH014968.1	EEUT ARG22E1
25A	<i>Microbacterium oxydans</i>	HG934375.1	EEUT ARG25A
27-3	<i>Bacillus infantis</i>	CP006643.1	EEUT ARG27

Kasutatud 15 bakteritüvede isolaati iseloomustati ka biokeemiliste testide järgi. Mikroobe vesinikperoksiidi tilgas suspendeerides saab tuvastada katalaasset aktiivsust. Hapnikumullide tekkimine näitab positiivset tulemust. Gramreaktiivsuse kiirtestis viidi KOH tilga sisse tikuga isolaati ning kui tiku külge tekkis limane niit, siis oli tegemist GN bakteriga. Oksüdaastestis kasutati paberist testribasid, millele lisati baktereid. Riba siniseks värvumisel oli oksüdaastesti tulemus positiivne. (Heinaru & Naanuri, 2015)

Isolaatide käärimistüübi (oksüdatsiooni / fermentatsiooni test) määramiseks kasutati torkekülvi Hugh-Leifsoni söötmesse. Seejärel valati ühele katseklaaside komplektile peale vesiagari kork. Teine katseklaaside komplekt oli ilma korgita. Pärast kasvatamist 30°C juures vaadati söötme värvuse muutust. Kui korgiga ja korgita söötmed värvusid mõlemad kollaseks, siis on külvatud isolaat kääritaja (F). Ainult korgita söötme kollaseks värvumise puhul on tegemist oksüdeerijaga (O). Mõlema söötme mittevärvumisel on tulemus negatiivne. (Heinaru & Naanuri, 2015)

Christenseni söötmes testiti urea hüdrolüüsimeetodit ureaasi toimel. Söötme aluseliseks muutumisel oli tulemus positiivne. Tsitraadi kasutamist süsinikuallikana testiti Simmons agaris. Kasvu esinemine koos söötme värvimuutusega tähendas positiivset tulemust. (Heinaru & Naanuri, 2015)

Hiltay söödet kasutati denitrifikatsiooni testi jaoks. Positiivseks tulemuseks oli gaasimullide ja sinise värvuse olemasolu söötmes. Voges-Proskaueri (VP) test tehti pärast MR-VP söötmele inokuleerimist. Ensüümide aktiivsust määrati veel järgmistes katsetes: indooltestis (trüptofanaas), tärklise söötmes (amülaas), želatiini söötmes (proteaas), eskuliini agaris (β -glükosidaas) ja arginiini dihidrolaasi (ADH) katses. (Heinaru & Naanuri, 2015)

15 isolaadil testiti seitsme süsinikuallika kasutamist: sahharoos (Suc), glükoos (Glc), fruktoos (Fru), ksüloos (Xyl), arabinoos (Ara), mannitool (Man) ja maltoos (Malt). Hemoglobiini lagundamist katsetati hemoglobiin + R2A söötmel. King B söötmega tase kasutati fluorestseeruvate pigmentide tuvastamiseks. (Heinaru & Naanuri, 2015)

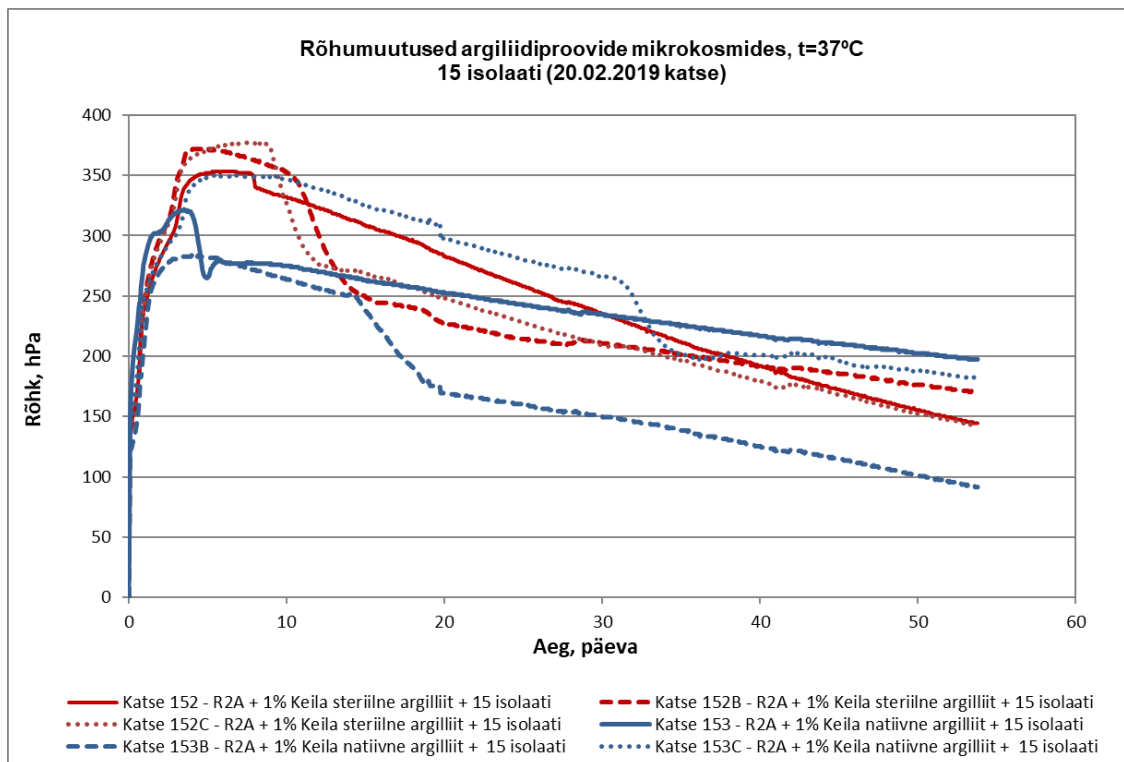
Isolaatide soolataluvust testiti LB söötmega tassidel, mille soola kontsentratsioonid olid erinevad: 0%, 2%, 5%, 7%, 10%. pH-taluvust testiti LB + glükoos tassidel. Söötmete erinevad pH tasemed olid järgmised: pH 3, 5, 7, 9, 11. Tasse inkubeeriti 30 °C juures.

LB söötmega tassidel kasvatati isolaate 48 tunni jooksul erinevatel temperatuuridel. Kõige madalam temperatuur oli 4°C ja kõrgeim oli 60°C. Pärast seda hinnati, kasvu levikut külvihoone ümber. Joonte kitsusi ja laiusi rühmitati katse tulemuste puhul.

Isolaatide preparaate värviti Grami meetodi järgi. Värvitud preparaate uuriti mikroskoobi all ja seejärel pildistati. Lääts ja preparaadi vahel oli õlikiht. Mikroskoobi abil määrati bakterirakkude kuju (batsill või kokk) ja spooride esinemine. (Heinaru & Naanuri, 2015)

2.3 Tulemused ja arutelu

OxiTop® katsed rõhu mõõtmiseks katsepudelites kestsid 20. veebruar kuni 15. aprill 2019. Seega koguti mõõtetulemusi peaaegu kahe kuu pikkusel ajavahemikul. Kuuelts katselt saadud rõhu mõõtmise tulemused on esitatud joonisel 4.



Joonis 4. Rõhmuutused argilliidiga OxiTop® katsetes

Esimestel päevadel tõusis gaasi eraldumine kõigi kuue katse puhul järsult. Gaasi tekke tulemusel tõusid rõhud pudelites kõige kõrgemale tasemele neljanda ja üheksanda katsepäeva vahelisel ajal. Mõõtmiste maksimaalsed väärtused jäid vahemikku 275 kuni 375 hPa. Sellest edaspidi oli rõhk pidevas langemises kuni katse lõpuni.

Steriilse ja natiivse argilliidiga tehtud katsetes oli üldine gaasitekkimise erinevus väike. Kummalgi juhul metaani ei tekkinud, sest metaan saab argilliidist tekkida üksnes metanogeensete arhede toimel.

Tabelites 4 ja 5 on toodud ära biokeemiliste katsete tulemused. Positiivne tulemus on näidatud märgiga (+) ja negatiivne märgiga (-). Osadel söötmetel ei läinud bakterid kasvama ning seetõttu on selline tulemus märgitud kui (0). Hemoglobiini lagundamise puhul tähistab (N) norka lagundamist. Suhkrute söötmete juures on osade positiivsete tulemuste juurde märgitud (G), mis tähistab gaasi tekkimist.

Tabel 4. Biokeemiliste katsete tulemused

Isolaadi nr	Raku kuju	Spoorid (gram prep. järgi)	Gram	KOH	Katalaas	Oksüdaas	Hugh-L. O/F	Ureaas	Hemoglobiini lagundamine	Tsitraat	Denitrifikats.
1	pulkbakter	-	GN	GN	+	+	F	-	-	0	+
5	kokobatsill?	-	GN	GN	-	-	F/O	+	-	+	-
7A2	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	-	-	+	0	-
7B11	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	-	-	+	0	-
7B4 (v)	pulkbakter	+	GP	GP	+	-	-	-	-	0	-
7B4 (lp)	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	-	-	-	0	-
10A (v)	pulkbakter	+	GP	GP	+	-	-	-	N	+	-
10B (lp)	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	-	-	N	+	-
12	pulkbakter	+	GP	GP	+	-	F	-	+	0	-
14B3	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	-	-	-	0	-
16A1	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	-	+	+	0	-
18	kokk, tetraadidena	-	GP	GP	+	-	F/O	+	-	0	-
22E1	kokk, kobaratena	-	GP	GP	+	-	F/O	+	-	0	-
25A	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	F/O	-	N	+	-
27-3	pulkbakter	-	GP	GP	+	-	-	+	-	0	-

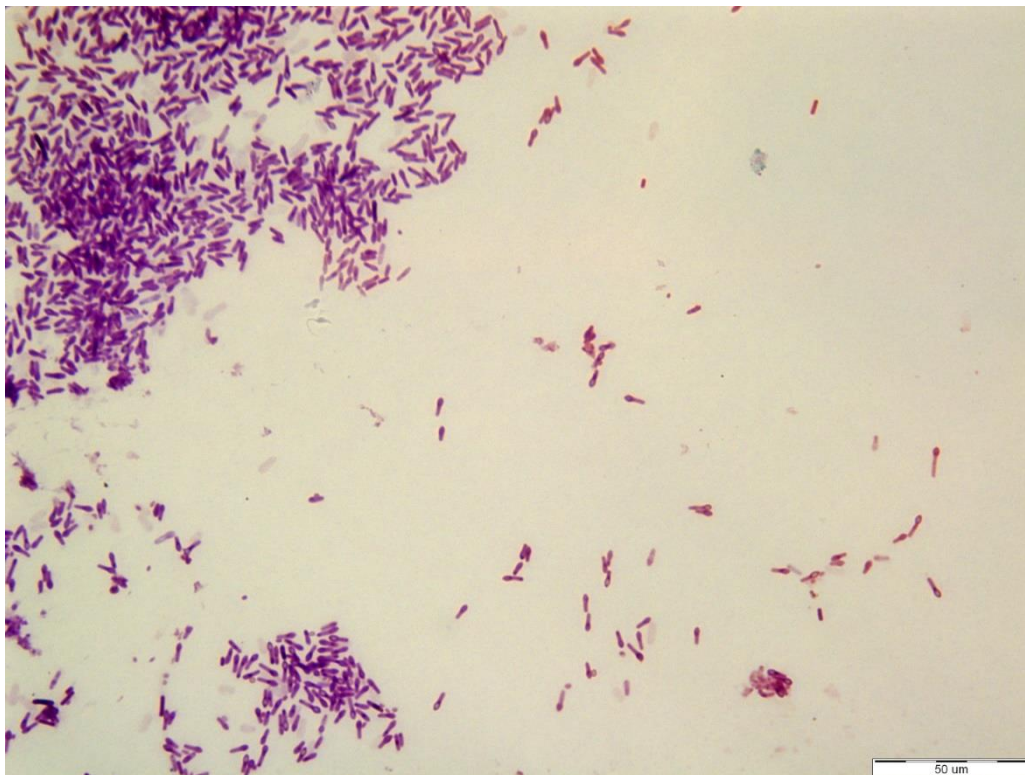
Tabel 5. Biokeemiliste katsete tulemused (jätkub)

Isolaadi nr	Suc	Glc	Fru	Xyl	Ara	Man	Malt	Ind	Tär	Žel	Esk	KingB	ADH	VP
1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
5	+ G	+	+ G	+ G	+ G	+	+ G	-	-	-	+	-	+	+
7A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7B11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7B4 (v)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
7B4 (lp)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
10A (v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10B (lp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+ / -	+ / -	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
14B3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
16A1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
22E1	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
25A	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
27-3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Isolaadid olid enamuses grampositiivsed, välja arvatud isolaat 1 (*Pseudomonas stutzeri*) ja isolaat 5 (*Enterobacter hormaechei*). Katalaasne aktiivsus puudus ainult isolaadil 5, kes ainukesena tekitas gaasimulle süsinikuallikate söötmes ning omas Voges-Proskaueri testis positiivset tulemust. Isolaadil 1 oli ainsana positiivne tulemus denitrifikatsiooni- ja oksüdaastestis.

Uuritavatel isolaatidel ei esinenud trüptofanaasest aktiivsust. Kovacsi reaktiivi lisamisel söötmele positiivset vastust indooli olemasolu kohta ei esinenud. Ükski isolaat ei andnud positiivset tulemust fluorestseerumisest King B söötmel.

Kivimites leiduvatel mikroorganismidel on oma loomulikus elukeskkonnas harva kõik eluks vajalikud tingimused (sobiv pH, temperatuur, vesi, toitained) olemas. Ühes keerulistes oludes ellujäämise strateegiaks on spooride moodustumine, mis on iseloomulik paljudele grampositiivsetele perekonna *Bacillus* esindajatele. Isolaatidel 7B4 (v) (*Paenibacillus glucanolyticus*), 10A (*Bacillus fusiformis*) ja 12 (*Bacillus cereus*) esinesidki spoorid. Mikroorganismide morfoloogia kirjeldamisel on oluline märgata ka spoori asukohta ning seda, kas ta paisutab mikroobirakku või mitte. Isolaadil 12 ei paisutanud spoor rakku. Ülejäänud kahel isolaadil paisutas spoor rakku terminaalselt. Isolaat 10A spooridega rakud on näidatud joonisel 5.



Joonis 5. Isolaat 10A rakud koos paisutavate spooridega.

Edaspidise kasutamise seisukohalt on eriti tehnoloogiliste mikroobitüvede puhul oluline nende optimaalne temperatuurivahemik. LB söötmetel kasvatatud isolaatide temperatuuritaluvused on esitatud tabelis 6. Suurem osa isolaatidest kasvavad vahemikus 25 °C kuni 42 °C üsna edukalt. Isolaadid 1 (*Pseudomonas stutzeri*) ja 25A (*Microbacterium oxydans*) suutsid madalamatel temperatuuridel kiiremini kasvada. Isolaat 14B3 (*Bacillus thermoamylovorans*) kasvas ainsana 50 °C kõrgematel temperatuuridel edukalt.

Tabel 6. Kasv erinevatel temperatuuridel 48h tunni jooksul

	4°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C	42°C	50°C	55°C	60°C
1	-	++	+	+	++	+	+	++	-	-	-
5	-	+	++	++	+++	+++	+++	++	-	-	-
7A2	-	-	-	+	-	++	+++	-	-	-	-
7B11	-	-	+	++	+	+++	+++	++	-	-	-
7B4v	-	(+)	+	++	+++	+++	+++	++	-	-	-
7B4lp	-	+	++	++	+++	+++	+++	++	-	-	-
10A	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	-	-	-
10B	-	-	+	+	++	+++	+++	+++	-	-	-
12	-	-	(+)	+	++	++	+++	+++	-	-	-
14B3	-	-	-	-	-	+	++	++	++	+++	-
16	-	-	-	-	(+)	++	+++	++	-	-	-
18	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
22	-	-	+	+	++	++	+++	+++	-	-	-
25A	+	+	+	++	++	++	++	-	-	-	-
27	-	-	-	+	++	++	+++	+++	-	-	-

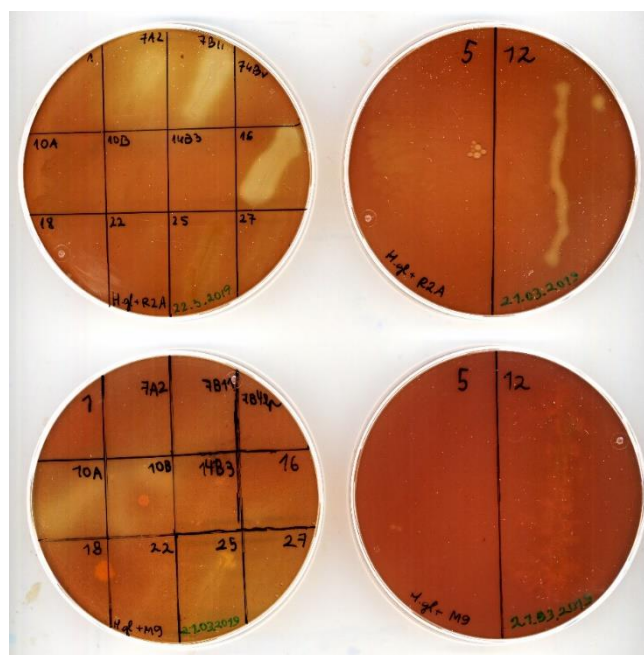
Tabelis 7 on esitatud isolaatide pH- ja soolataluvused. Ükski isolaat ei talunud tugevalt happelist keskkonda. Isolaat 22 oli ainus, kes talus kõrgemat soolsust kui 7% ning üks vähestest, kes talus kerget happelisust.

Uuritud 15 isolaati ei talunud tugevalt happelist keskkonda ja kõrgemat temperatuuri kui 55 °C. Tuleb pidada silmas, et metallide bioleostamisel võib suureneda temperatuur ja happelisus keskkonnas (Rawlings & Johnson, 2007). Seetõttu ei pruugi antud isolaadid olla tööstuslikul tasemel edukalt kasutatavad. Samas oli isolaatide pH- ja temperatuurieelistused sarnased porfüriine lagundavate bakteritega. (Cordero *et al.*, 2015)

Hemoglobiini on kasutatud kui mudelainet metalloporfüriinide lagundamise uurimisel. Töös uuritud 15 isolaadist märgati hemoglobiini sisaldava R2A söötme valastumist järgmiste isolaatide puhul 7A (*Bacillus jeotgali*), 7B11 (*Bacillus thioparans*), 10A, 10B (mõlemad *Bacillus fusiformis*), 12 (*Bacillus cereus*) ja 16 (*Bacillus humi*) (joonis 6). Nendest isolaatidest koostatud uut kooslust võiks katsetada kui potentsiaalsest metallorgaaniliste ühendite lagundajat kiltades.

Tabel 7. Isolaatide pH- ja soolataluvused

	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11	0%	2%	5%	7%	10%
1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7A2	-	-	- ?	+	-	+	+	+	+	-
7B11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
7B4v	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
7B4lp	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
10A	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
10B	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14B3	-	-	+	+	+	?	?	?	?	-
16	-	-	+	+	?	+	+	-	-	-
18	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
22	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
27	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-



Joonis 6. Isolaatide hemoglobiini tarbimine söötmetel R2A (ülemine rida) ja M9 (alumine rida).

Järeldused

1. Anaeroobses kasvatuskatses uuritud isolaatidega tekkis gaasi vähe, kusjuures erinevus steriilse ja natiivse argillidi vahel oli väike. Kummalgi juhul metaani ei tekkinud, sest metaan saab argilliidist tekkida üksnes metanogeensete arhede toimel.

2. Käesoleva töö raames tehtud biokeemilised testid võimaldasid uuritud isolaadid kanda Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi juures asuvasse Looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsiooni CELMS (http://eemb.ut.ee/celms/main_list.php, Tabel 3).
3. Hemoglobiini valastavatest isolaatidest koostatud uut kooslust võiks katsetada kui potentsiaalsest metallorgaaniliste ühendite lagundajat kiltades.

KOKKUVÕTE

Käesolevas lõputöös iseloomustati Eesti graptoliitargilliidist isoleeritud bakteritüvesid. Selleks kasutati OxiTop®-süsteemiga läbiviidud kultiveerimiskatseid 15 argilliidist eraldatud isolaadiga ning steriilse ja natiivse argilliidiga. Katsete käivitamisel mõõdeti katseseadmes toimuvaid rõhumuutusi.

Steriilse ja natiivse argilliidiga tehtud katsetes oli üldine gaasitekkimise erinevus väike. Kummalgi juhul metaani ei tekkinud.

Samade isolaatidega tehti biokeemilisi teste. Katseid tehti erinevate ensüümide aktiivsustega ja süsivesikute kasutamisega. Selleks külvati ja inkubeeriti isolaate katsele vastavates söötmetes. Enamus teste said positiivse tulemuse vähemalt ühelt uuritava isolaadiga. Trüptofanaasi test ja King B test (fluorstseeruvate pseudomonaadide määramiseks) olid kõigi isolaatidega negatiivsed.

Gram-reaktiivsuse uurimiseks kasutati KOH testi ja värvimist. Preparaatide Grami järgi värvimise järel uuriti mikroskoobiga isolaatide rakkude kuju ja spooride esinemist. Isolaatide hulgas leidis nii kokke kui ka batsille. Enamus isolaatidest olid spoorideta GP bakterid.

Isolaadid eelistasid kõige paremini kasvada 30°C kuni 40°C juures. Äärmuslikel temperatuuridel ei tekkinud kasvu 48 h jooksul. Bakterid üldiselt ei kasvanud happeliste tingimuste käes ning soolsuse taluvus vähenes, kui soolsus oli kõrgem kui 5%.

Hemoglobiini valastavatest isolaatidest 7A (*Bacillus jeotgali*), 7B11 (*Bacillus thioparans*), 10A, 10B (mõlemad *Bacillus fusiformis*), 12 (*Bacillus cereus*) ja 16 (*Bacillus humi*) koostatud uut kooslust võiks katsetada kui potentsiaalsest metallorgaaniliste ühendite lagundajat kiltades.

Description of bacterial isolates from graptolite argillite

Esper Rasmus Antson

SUMMARY

The graptolite argillite is an organic-rich black shale found in Northern Estonia. The rock has notably higher concentration of valuable metals. High content of U and V have been confirmed in various research articles.

The possibility of using microorganisms in extracting metals from different black shales has been topic of research for many years. Development and active use of bioleaching techniques in mines has proven to be successful. Microorganisms used in leaching are usually isolated from rocks where microorganisms live.

The aim of this study was:

- Characterization bacterial microorganisms living inside of argillite.
- Measuring change of pressure during OxiTop® cultivation tests.
- Determining differences of bacterial isolates by using biochemical tests.

OxiTop® reactors, where argillite was added, were inoculated with 15 bacterial isolates. These isolates originated from graptolite argillite found in Northern Estonia. Synthesis of gases by bacteria created rise of pressure, which was measured with automatic device.

These 15 isolated bacteria were also used in biochemical tests. Different cultivation media were used to determine presence of various enzymes and find consumption differences of bacterial isolates. Bacteria were used to test their tolerance and survivability to different temperatures. Grown on LB media, their growth was tested with temperature ranges between 4°C to 60°C. Their tests of tolerance to media with pH and salinity variations were included.

Gram staining was used to categorize isolated bacteria. Observations with microscope were used to determine isolates' shapes and the presence of spores.

A new combination of hemoglobin decomposing isolates 7A (*Bacillus jeotgali*), 7B11 (*Bacillus thioparans*), 10A, 10B (both *Bacillus fusiformis*), 12 (*Bacillus cereus*) and 16 (*Bacillus humi*) could be tested as a potential decomposer of organometallic compounds.

TÄNUSÕNAD

Ma soovin tänada Triin Korbi, kes kannatlikult jagas abistavaid juhtnööre katsete tegemisel. Oma juhendajat, Anne Menertit, tänan ma sihikindla ja mõistva toetamise eest. Lõpuks soovin tänada oma perekonda antud abi eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Algeo, T. J. & Lyons, T. W. (2006). Mo-total organic carbon covariation in modern anoxic marine environments: implications for analysis of paleoredox and paleohydrographic conditions. *Paleoceanography*, 21, PA1016.
2. Ceci, A., Pinzari, F., Riccardi, C., Maggi, O., Pierro, L., Petrangeli Papini, M., Gadd, G. M., & Persiani, A. M. (2018). Metabolic synergies in the biotransformation of organic and metallic toxic compounds by a saprotrophic soil fungus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 1019–1033. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8614-9>
3. Colosimo, F., Thomas, R., Lloyd, J. R., Taylor, K. G., Boothman, C., Smith, A. D., Lord, R., & Kalin, R. M. (2016). Biogenic methane in shale gas and coal bed methane: A review of current knowledge and gaps. *International Journal of Coal Geology*, 165, 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2016.08.011>
4. Cordero, P. R. F., Bennett, R. M., Bautista, G. S., Aguilar, J. P. P., & Dedeles, G. R. (2015). Degradation of nickel protoporphyrin disodium and vanadium oxide octaethylporphyrin by philippine microbial consortia. *Bioremediation Journal*, 19(2), 93–103. <https://doi.org/10.1080/10889868.2013.827616>
5. Coveney, R. M., & Pašava, J. (2004). Diverse connections between ores and organic matter. *Ore Geology Reviews*, 24(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2003.08.002>
6. Czernuszewicz, R. S. (2000). Geochemistry of porphyrins: Biological, industrial and environmental aspects. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 4(4), 426–431. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1409\(200006/07\)4:4<426::AID-JPP248>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1409(200006/07)4:4<426::AID-JPP248>3.0.CO;2-1)
7. Gadd, M. G., Peter, J. M., Jackson, S. E., Yang, Z., & Petts, D. (2019). Platinum, Pd, Mo, Au and Re deportment in hyper-enriched black shale Ni-Zn-Mo-PGE mineralization, Peel River, Yukon, Canada. *Ore Geology Reviews*, 107(March), 600–614. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2019.02.030>
8. Gromet, L. P., Dymek, R. F., Haskin, L. A., Korotev, R. L. (1984). The “North American shale composite”: its compilation, major and trace element characteristics. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 48, 2469–2482.
9. Hallberg, K. B. & Johnson, D. B. (2001). Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv Appl Microbiol* 49, 37–84.
10. Heinaru, E. Naanuri, E. 2015. *Praktilisi töid mikrobioloogiast*. Tartu: Tartu Ülikool
11. Hints, R., Soesoo, A., Voolma, M., Tarros, S., Kallaste, T., & Hade, S. (2014). Centimetre-scale variability of redox-sensitive elements in Tremadocian black shales from the eastern Baltic Palaeobasin. *Estonian Journal of Earth Sciences*, 63(4), 233–239. <https://doi.org/10.3176/earth.2014.24>
12. Kamradt, A., Borg, G., Schaefer, J., Kruse, S., Fiedler, M., Romm, P., Schippers, A., Gorny, R., Du Bois, M., Bieligk, C., Liebetrau, N., Nell, S., Friedrich, B., Morgenroth, H., Wotruba, H., & Merkel, C. (2012). An integrated process for innovative extraction of metals from Kupferschiefer mine dumps, Germany. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 84(10), 1694–1703. <https://doi.org/10.1002/cite.201200070>
13. Kucha, H. (1982). Platinum-group metals in the zechstein copper deposits, Poland-a reply. *Economic Geology*, 77, 1578–1591. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.80.2.519>
14. Kutschke, S., Guézennec, A. G., Hedrich, S., Schippers, A., Borg, G., Kamradt, A., Gouin, J., Giebner, F., Schopf, S., Schlömann, M., Rahfeld, A., Gutzmer, J., D'Hugues, P., Pollmann, K., Dirlich, S., & Bodéan, F. (2015). Bioleaching of Kupferschiefer blackshale - A review including perspectives of the Ecometals project. *Minerals Engineering*, 75, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2014.09.015>
15. Laznicka, P. (1999). Quantitative relationships among giant deposits of metals.

- Economic Geology*, 94(4), 455–473. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.94.4.455>
16. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. 2012. Brock biology of microorganisms. 13th ed., Pearson, Boston.
 17. Mahmoud, A., Cézac, P., Hoadley, A. F. A., Contamine, F., & D'Hugues, P. (2017). A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 119(April), 118–146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.015>
 18. Martini, A. M., Walter, L. M., Ku, T. C. W., Budai, J. M., McIntosh, J. C., & Schoell, M. (2003). Microbial production and modification of gases in sedimentary basins: A geochemical case study from a Devonian shale gas play, Michigan basin. *AAPG Bulletin*, 87(8), 1355–1375. <https://doi.org/10.1306/031903200184>
 19. Melezhik, V. A., Filippov, M. M., & Romashkin, A. E. (2004). A giant Palaeoproterozoic deposit of shungite in NW Russia: Genesis and practical applications. *Ore Geology Reviews*, 24(1–2), 135–154. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2003.08.003>
 20. Pukkonen, E., Rammo, M. (1992). Distribution of molybdenum and uranium in the Tremadoc graptolitic argillite (Dictyonema shale) of North-Western Estonia. *Bulletin of the Geological Survey of Estonia*, 2(1), 3–15.
 21. Rawlings, D. E., & Johnson, D. B. (2007). The microbiology of biomining: Development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153(2), 315–324. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001206-0>
 22. Rawlings, D. E. & Silver, S. (1995). Mining with microbes. *Bio/ Technology* 13, 773–779.
 23. Ritter, D., Vinson, D., Barnhart, E., Akob, D. M., Fields, M. W., Cunningham, A. B., Orem, W., & McIntosh, J. C. (2015). Enhanced microbial coalbed methane generation: A review of research, commercial activity, and remaining challenges. *International Journal of Coal Geology*, 146, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2015.04.013>
 24. Taylor, S. R., McLennan, S. M. 1985. *The Continental Crust: its Composition and Evolution*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
 25. Utsal, K., Kivimägi, E., Utsal, V. (1982). About the method of investigating Estonian graptolitic argillite and its mineralogy. *Acta et Commentationes Universitatis Tartuensis*, No. 527, Tartu, 116–136
 26. Vine, J. D., Tourtelot, E. B. (1970). Geochemistry of black shale deposits – a summary report. *Econ. Geol.*, 65, 253–272.
 27. Voolma, M., Soesoo, A., Hade, S., Hints, R., & Kallaste, T. (2013). Geochemical heterogeneity of Estonian graptolite argillite. *Oil Shale*, 30(3), 377–401. <https://doi.org/10.3176/oil.2013.3.02>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Esper Rasmus Antson (sünnikuupäev: 07.06.1996),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Graptoliitargilliidist eraldatud bakteriaalsete isolaatide kirjeldamine,

mille juhendaja on Anne Menert,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Esper Rasmus Antson

08.06.2020